

pH の異なるハイドロキシアパタイトを キトサンで結合させた骨形成用材料について

田村 郁

大学院歯学独立研究科 硬組織疾患制御再建学講座
(主指導教員：伊藤 充雄 教授)

松本歯科大学大学院歯学独立研究科博士（歯学）学位申請論文

Study on hydroxyapatite of various pH bonded with chitosan as bone regeneration material

KAORU TAMURA

*Department of Hard Tissue Research, Graduate School of Oral Medicine,
Matsumoto Dental University
(Chief Academic Advisor : Professor Michio Ito)*

The thesis submitted to the Graduate School of Oral Medicine,
Matsumoto Dental University, for the degree Ph.D. (in Dentistry)

緒 言

近年、骨欠損部の修復は自家骨移植やハイドロキシアパタイトなどにより行われている。自家骨移植は、採骨時に患者への肉体的と精神的な大きな負担が伴う事と、採骨部での侵襲が生じることなどが推測される。

顆粒状ハイドロキシアパタイトについては20 μm 以下の顆粒を使用した場合、抜歯窩や骨欠損部に充填した顆粒が移動して歯肉と顎骨との間に侵入し、咬合圧によって歯肉に炎症が起こった症例や、感染を誘発した症例が報告されている¹⁻⁴⁾。また粒径の小さなハイドロキシアパタイトはマクロファージや異物巨細胞に貪食されやすく、充填部位に留めておくことが困難とされる⁵⁾。

また、ハイドロキシアパタイト顆粒をコラーゲ

ンなどを用いて賦形したブロック状骨補填材料は、補填前に欠損部に合わせた形態修正が必要なことや、生体内で先にコラーゲンのみが分解吸収されハイドロキシアパタイト顆粒が同様に遊離することがある。これらの問題を解決するためには自家骨と同様に骨と同化し骨伝導する材料であること、また賦形性を有しており自己硬化して移動しない材料にする必要がある。今回作製した材料は、ハイドロキシアパタイト顆粒をキトサンで結合したものである。練和によってゲル化し、湿潤状態ではゴム状の弾性体になる。弾性体であることは、顎堤の再建時に歯肉と骨との間に充填した本材料が咬合圧の負荷によって、歯肉を刺激しない利点がある。

ハイドロキシアパタイト顆粒は、純粋なハイドロキシアパタイトがCa/Pモル比1.67であるのに

対して、今回は Ca/P モル比が1.718のものを用いた。Ca/P モル比については、1.5以下の場合1,000°Cに加熱すると、CaHPO₄とハイドロキシアパタイトの2相になり、1.5以上1.7以下でβ-TCPとハイドロキシアパタイトの2相、そして1.7以上の場合にはCaOとハイドロキシアパタイトの2相になることが報告されている^{6,7)}。ハイドロキシアパタイトの表面にCaOが析出することによって、pHが7.9から11.1に上昇しアルカリ化する。アルカリ化することで、外科的侵襲によって酸性化した組織を早期に中和できると考えられる。また、Caイオン溶出量も純粋なハイドロキシアパタイトと比較して増加傾向を示す⁶⁻⁸⁾。Caイオン溶出量が多いと多核巨細胞の出現が多く、骨形成量も多いという報告もある⁹⁾。また、Caイオンの濃度は、骨形成やアルカリフォスファターゼ活性に重要な因子となる。アルカリフォスファターゼは石灰化を起こすための重要な酵素であり、高濃度のCaイオン下で骨芽細胞を培養した場合、石灰化物の形成が始まる時期に急激にアルカリフォスファターゼ活性が高まり、石灰化の完了と共に低下すると報告されている¹⁰⁾。また、今回と同様に900°Cで焼成したハイドロキシアパタイトを用いた場合に、骨芽細胞のアルカリフォスファターゼ活性が著しく上昇することが報告されている¹¹⁾。以上の利点を考慮し、Ca/Pモル比1.718のハイドロキシアパタイトを化学合成したままの状態(AS)と、900°Cで6時間大気中焼成した状態(900 H)の2種類を用いた。

キチンは、カニやカブトムシなど甲殻類や昆虫の外骨格から抽出することが出来る物質である。HClとNaOH溶液で無機塩とタンパクの除去を行い、キチンを抽出する。このキチンを40~50%のNaOH溶液にて80~120°Cで加熱して脱アセチル化し、キトサンを抽出する。

キチン、キトサンは抗原性が低い物質であり、異物巨細胞などの貪食細胞が出すリゾチーム等の体内酵素で分解され、N-アセチルグルコサミンなどの単糖を経て、最終的にはグリコプロテインとして貯えられるか、炭酸ガスとして呼吸により排出される。キチン、キトサンは人体内には存在しないが、分解途中のN-アセチルグルコサミンなどは、人体に大量に存在する。このためにキチン、キトサンに対しての生体の認識が他の材料ほ

ど強くないと考えられている¹²⁾。さらにキチン、キトサンには創傷治癒促進効果も報告されている。キチン、キトサンが損傷組織に作用するとマクロファージ産生が増加し、それに伴って治癒促進の重要な要因であるリゾチーム陽性細胞が増加する。また線維芽細胞の増殖が促進され、コラーゲンを産生する。この時にキチン、キトサンがあると径の太いI型コラーゲンより径の細いIII型コラーゲンがより多く産生され、生成した肉芽組織内への血管新生がより早く認められる。このために創傷の治癒が早期に起こると考えられている^{12,13)}。その他に、キチン、キトサンには血小板凝集作用による止血効果¹²⁻¹⁵⁾や、Caイオンなどの2価のアルカリ土類金属イオンを高い効率で吸着しやすい性質も報告されている¹⁶⁾。

これらの事から、現在、キチン、キトサンは生体材料として吸収性縫合糸、人工皮膚や歯科用セメントに用いられている。

キトサンは有機酸によって容易にゾル化することが出来る。キトサンは脱アセチル化度によって機械的性質や生体内での吸収速度や反応が異なる。脱アセチル化度が高いキトサンを用いると機械的強度は小さくなり、生体内では脱アセチル化度の低いキトサンを用いた場合には吸収速度が増加するとされている¹⁷⁻²¹⁾。また、脱アセチル化度の低いキトサンフィルムは炎症性反応が強く、肉芽組織形成も旺盛であり、骨吸収を誘発する傾向が認められたことが報告されている^{17,18)}。本実験では脱アセチル化度94%のものを用い、キトサンのゾル化剤として生理食塩水とリンゴ酸、ゲル化剤としてCaOとZnOを使用し、キトサンゾル中のキトサン量と、異なる2種類のハイドロキシアパタイトが、試験片の機械的性質、そして生体反応にどのように影響するのかについて検討した。

実験材料及び方法

実験に用いた材料は、分子量が10⁶で脱アセチル化度94%のキトサン(pH7.6、焼津水産化学工業株式会社)とリンゴ酸(pH2.7、関東化学株式会社)、そして生理食塩水(pH6.4、大塚製薬株式会社)を用いてキトサンゾルを作製した。粉末は酸化カルシウム(pH11.8、和光純薬工業株式会社)と酸化亜鉛(pH7.4、関東化学株式会社)、

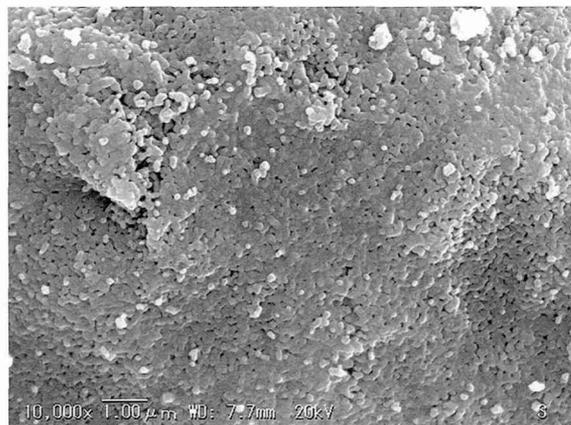


図1：ハイドロキシアパタイト顆粒表面 SEM 像 (AS)

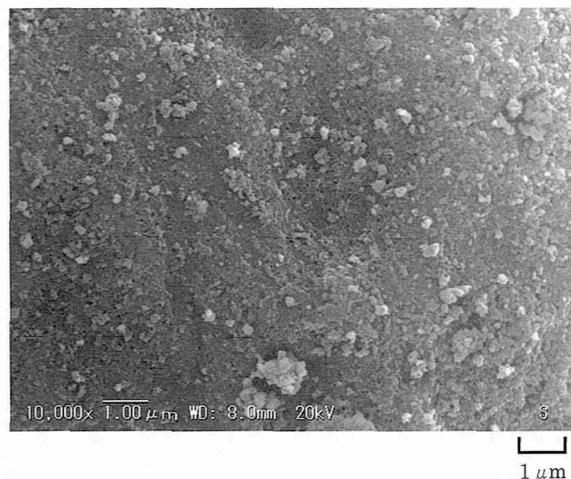


図2：ハイドロキシアパタイト顆粒表面 SEM 像 (900H)

そして平均粒径 $40\ \mu\text{m}$ の球状ハイドロキシアパタイト（アパミクロン[®]114 P，積水化成工業株式会社）を用いた。電子顕微鏡（VE-9800，株式会社キーエンス）により撮影したハイドロキシアパタイト顆粒表面像を図1，2に示す。ハイドロキシアパタイトは図1に示す化学合成したままのもの（pH7.9，以下ASと示す）と，図2に示すASを電気炉（SLC 115，セレック株式会社）を用いて 900°C で6時間大気中焼成し，顆粒表面にCaOを析出させアルカリ化したハイドロキシアパタイト（pH11.1，以下900Hと示す）の2種類を用いた。

1. キトサンゾルの作製

キトサン粉末 0.06g ， 0.08g ， 0.1g をそれぞれ， 2ml の生理食塩水中で吸水させた後，リンゴ酸 0.1g を加えてキトサンゾルとした。

2. 粉末の作製

ハイドロキシアパタイト 0.4g と，キトサンゾルのゲル化剤として，酸化カルシウム 0.02g ，酸化亜鉛 0.04g を混合し粉末とした。

3. 硬化時間の測定

各キトサンゾルと粉末を30秒間練和し，練和泥がエポキシ樹脂製の棒に付着しなくなった時間を硬化時間とした。測定は各条件5回ずつ行った。

4. 引張強さ，伸び，弾性係数の測定

各キトサンゾルと粉末を30秒間練和し，練和泥を図3に示すダンベル状樹脂型に填入して試験片を作製した。試験片は各条件5個作製した。測定は引張圧縮試験機（SL-5001，株式会社今田製作所）を用い，支点間距離 8mm ，クロスヘッドスピード $0.1\text{mm}/\text{min}$ で行った。試験片は硬化後に生理食塩水中に浸漬し，1日後に湿潤状態で測定を行った。

5. 圧縮強さの測定

各キトサンゾルと粉末を30秒間練和し，練和泥を図4に示す直径 6mm ，高さ 12mm の円筒状樹

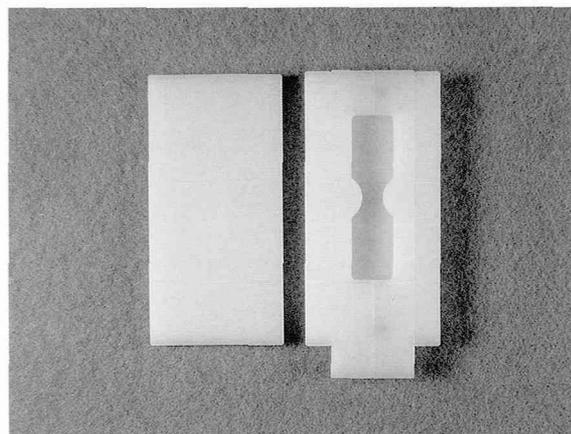


図3：引張試験用樹脂型

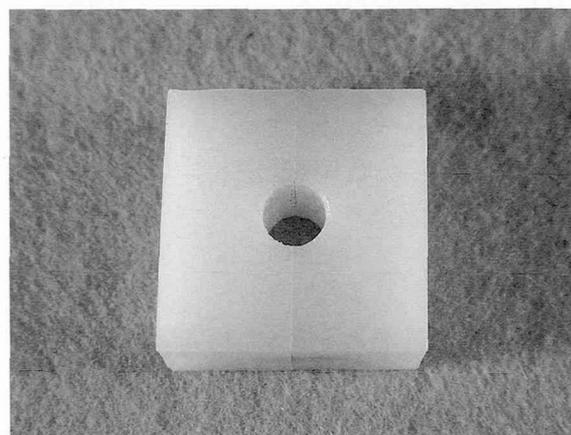


図4：圧縮試験用樹脂型

脂型に填入して試験片を作製した。試験片は各条件5個作製した。硬化1日後の乾燥状態の試験片を、引張圧縮試験機 (SL-5001, 株式会社今田製作所) を用いて、クロスヘッドスピード1 mm/min で圧縮試験を行った。

6. pHの測定

圧縮試験用の円筒状樹脂型を用いて各条件5個ずつ試験片を作製後、擬似体液として70mlの生理食塩水中に浸漬した。練和開始から30分, 1時間, 2時間, 3時間, 4時間, 5時間, 1日, 7日, 28日そして56日後のpHをpHメーター (MM-60R, 東亜ディーケーケー株式会社) で測定を行った。

7. 溶出元素量の測定

pHの測定を行った後の溶液を、0.45µmのシリンジフィルター (DISMIC 25HP, ADVANTEC) を用いて濾過し、Caイオン, PイオンとZnイオンの溶出量を高周波プラズマ発光分析装置 (ICPS-7510, 株式会社島津製作所) で各条件3個について3回ずつ測定を行った。またControlとして生理食塩水を測定した。

8. 浸漬前後の試験片の表面観察と表面粗さの測定

引張試験用のダンベル状樹脂型を用いて試験片を作製後、乾燥状態にしたもの、70mlの生理食塩水に1カ月浸漬後に乾燥状態にしたもの、そして70mlの生理食塩水に1年浸漬後に乾燥状態にした試験片の表面を共焦点レーザー顕微鏡 (OLS-3000, オリパス株式会社) で観察した。各条件5個ずつ観察を行った。

また共焦点レーザー顕微鏡に付属の解析ソフトを用いて、撮影した1024×768 Pixelの画像より算術平均粗さを求めた。算術平均粗さは、凹凸形状用ノイズ除去を行った後にJIS 1994のパラメータセットを用いて、カットオフ値1/10 (13.0µm) として算出した。

9. X線マイクロアナライザによる成分分析

表面観察を行った後の試験片をカーボンディスクに固定後、金蒸着を行い、Ca, P, Znの表面分布状態をX線マイクロアナライザ (JDX-3532, 日本電子株式会社) を用いて測定した。各条件3個ずつ測定を行った。

10. 組織反応試験

エチレンオキシサイドガス滅菌 (KS16, ELK)

を行った粉末成分と滅菌生理食塩水を用いて、無菌下で試験片を作製後、ラット脛骨に填入した。

実験には、7週齢Sprague-Dawley系SPFラット雄 (日本エスエルシー株式会社, 静岡) を用いた。1条件10匹, Controlとして、骨欠損部の作製のみを施したものを6匹用いた。実験はペントバルビタールナトリウム (ネプタール®注射液, 大日本住友製薬株式会社) 25mg/kgの腹腔内投与による全身麻酔下で、直径2.2mmのステール製ラウンドバー (#8, 株式会社モリタ) を用いて生理食塩水を注入しながら右側脛骨内側面に、直径3mmの欠損部を作製し、円筒状の試験片 (直径3mm, 長さ2mm) 填入した。2週後と4週後に、ジエチルエーテル吸入麻酔下で、胸腔を露出し、左心室より2.0%グルタルアルデヒドとパラホルムアルデヒド混合液 (pH7.4) で灌流固定を行い組織採取した後、同液に1日間浸漬固定した。10% EDTA溶液にて脱灰を行った後に、パラフィン包埋し、5µmで薄切してヘマトキシリン-エオシン染色を行い、光学顕微鏡 (BX 41, オリパス株式会社) にて観察を行った。

本実験は松本歯科大学動物実験室運営委員会の許可により遂行された。

11. 分散分析

各実験の測定値を二元および、三元配置分散分析を用い、99%の信頼限界において検討した。

結 果

1. 硬化時間の測定

図5に使用材料と硬化時間についての関係を示

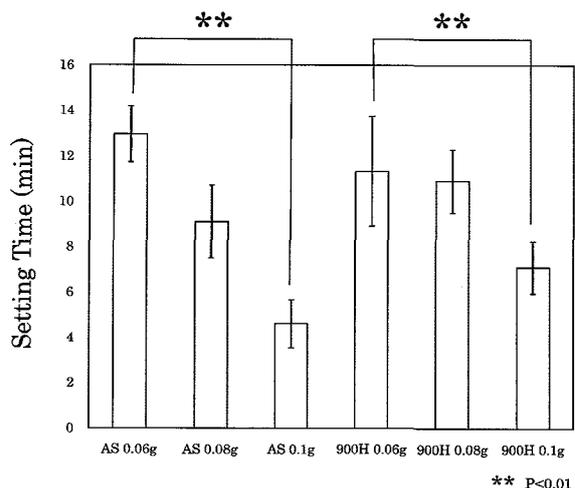


図5：硬化時間測定結果

表1：硬化時間 二元分散分析結果

Source	Sum of Square	Degree of Freedom	Mean Square	F value	Rate of Contribution
A : Kind of Hydroxyapatite	SA=5.970	1	VA=5.970	FA=2.366	0.000
B : Quantity of Chitosan	SB=204.460	2	VB=102.230	FB=40.514**	67.522
A×B	SAB=24.343	2	VAB=12.171	FAB=4.824	0.000
Error	SE= 60.559	24	VE=2.523		32.478
Total	S=295.333	29			

* : P<0.05 ** : P<0.01

表2：引張強さ 二元分散分析結果

Source	Sum of Square	Degree of Freedom	Mean Square	F value	Rate of Contribution
A : Kind of Hydroxyapatite	SA=0.004	1	VA=0.004	FA=1.523	0.000
B : Quantity of Chitosan	SB=1.073	2	VB=0.537	FB=225.036**	89.158
A×B	SAB=0.036	2	VAB=0.018	FAB=7.606**	2.669
Error	SE=0.086	36	VE=0.002		8.173
Total	S=1.199	41			

* : P<0.05 ** : P<0.01

す。硬化時間は、AS0.06gで 12.95 ± 1.23 分、AS0.08gで 9.10 ± 1.60 分、AS0.1gで 4.60 ± 1.07 分、900H0.06gで 11.33 ± 2.42 分、900H0.08gで 10.90 ± 1.39 分、900H0.1gで 7.10 ± 1.16 分であった。測定値を分散分析した結果を表1に示す。キトサン量が増加すると硬化時間は有意 ($P < 0.01$) に短くなった。

2. 引張強さ、伸び、弾性係数の測定

図6に使用材料と引張強さについての関係を示す。浸漬1日後の引張強さはAS0.06gで 0.085 ± 0.021 MPa、AS0.08gで 0.285 ± 0.048 MPa、AS0.1gで 0.544 ± 0.074 MPa、900H0.06gで 0.121 ± 0.023 MPa、900H0.08gで 0.294 ± 0.055 MPa、

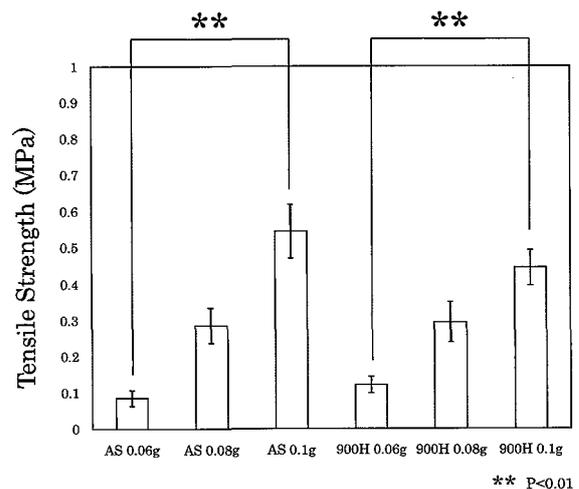


図6：引張強さ測定結果

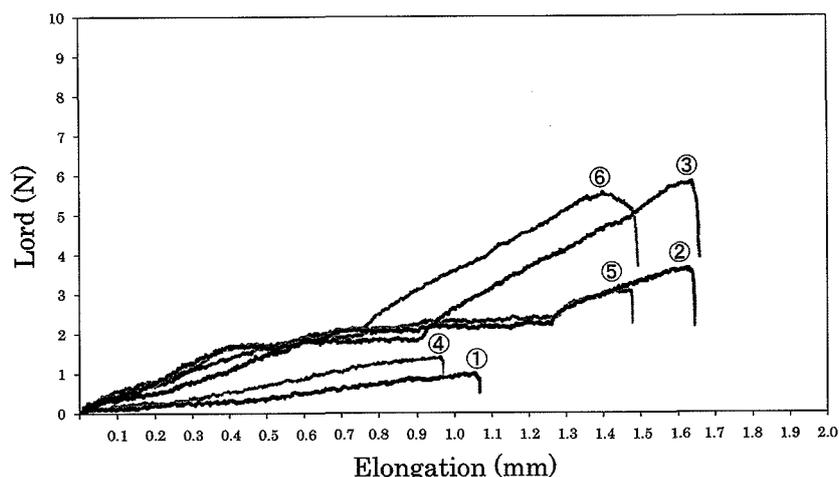


図7：荷重 - 伸び曲線

① : AS0.06g ② : AS0.08g ③ : AS0.1g
 ④ : 900H0.06g ⑤ : 900H0.08g ⑥ : 900H0.1g

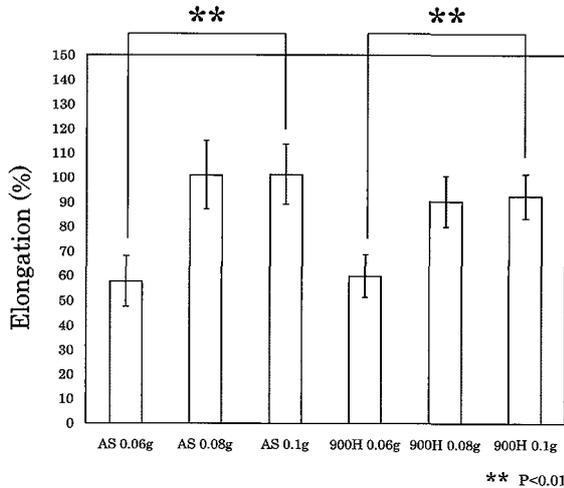


図8：伸び測定結果

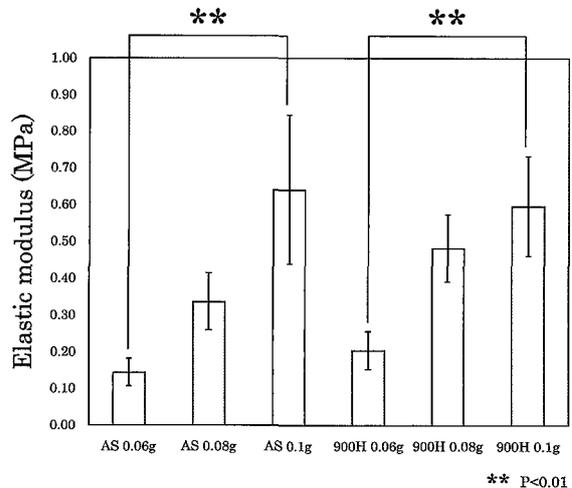


図9：弾性係数測定結果

表3：伸び 二元分散分析結果

Source	Sum of Square	Degree of Freedom	Mean Square	F value	Rate of Contribution
A : Kind of Hydroxyapatite	SA=351.482	1	VA=351.482	FA=2.977	0.000
B : Quantity of Chitosan	SB=13038.642	2	VB=6519.321	FB=55.210**	71.211
A×B	SAB=337.069	2	VAB=168.534	FAB=1.427	0.000
Error	SE=4250.971	36	VE=118.083		28.789
Total	S=17978.164	41			

* : P<0.05 ** : P<0.01

表4：弾性係数 二元分散分析結果

Source	Sum of Square	Degree of Freedom	Mean Square	F value	Rate of Contribution
A : Kind of Hydroxyapatite	SA=0.030	1	VA=0.030	FA=2.303	0.000
B : Quantity of Chitosan	SB=1.388	2	VB=0.694	FB=52.569**	69.561
A×B	SAB=0.064	2	VAB=0.032	FAB=2.440	0.000
Error	SE=0.475	36	VE=0.013		30.439
Total	S=1.958	41			

* : P<0.05 ** : P<0.01

900H0.1gで 0.444 ± 0.049 MPaであった。測定値を分散分析した結果を表2に示す。キトサン量が増加すると引張強さは有意 ($p < 0.01$) に大きくなった。

図7に引張試験から得られた荷重-伸び曲線の一例を、図8に使用材料と伸びについての関係を示す。浸漬1日後の伸びはAS0.06gで $57.85 \pm 10.24\%$ 、AS0.08gで $101.08 \pm 13.92\%$ 、AS0.1gで $101.28 \pm 12.22\%$ 、900H0.06gで $60.01 \pm 8.63\%$ 、900H0.08gで $90.40 \pm 10.24\%$ 、900H0.1gで $92.42 \pm 9.06\%$ であった。測定値を分散分析した結果を表3に示す。キトサン量が増加すると伸びは有意 ($P < 0.01$) に増大した。

図9に使用材料と弾性係数についての関係を示

す。AS0.06gで 0.144 ± 0.038 MPa、AS0.08gで 0.336 ± 0.078 MPa、AS0.1gで 0.641 ± 0.204 MPa、900H0.06gで 0.204 ± 0.051 MPa、900H0.08gで 0.481 ± 0.091 MPa、900H0.1gで 0.596 ± 0.136 MPaであった。測定値を分散分析した結果を表4に示す。キトサン量が増加すると弾性係数は有意 ($P < 0.01$) に大きくなった。

3. 圧縮強さの測定

図10に使用材料と圧縮強さについての関係を示す。圧縮強さはAS0.06gで 6.697 ± 0.489 MPa、AS0.08gで 8.149 ± 1.180 MPa、AS0.1gで 15.507 ± 2.942 MPa、900H0.06gで 2.362 ± 0.466 MPa、900H0.08gで 4.481 ± 1.111 MPa、900H0.1gで 4.603 ± 0.953 MPaであった。測定値を分散分析

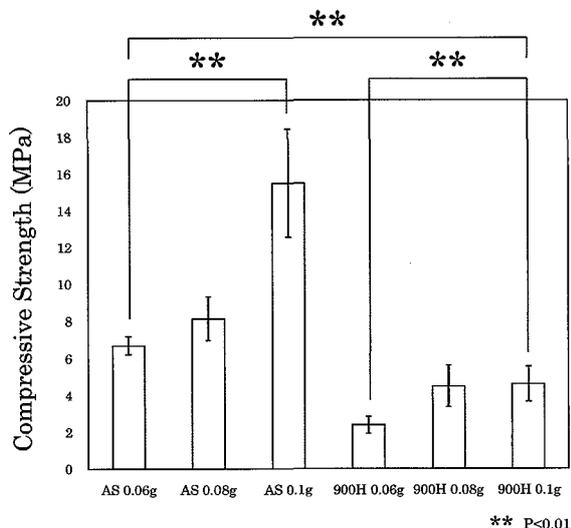


図10：圧縮強さ測定結果

した結果を表5に示す。キトサン量が増加すると圧縮強さは有意 ($P < 0.01$) に大きくなった。また900Hを用いた時に圧縮強さは有意 ($P < 0.01$)

に小さくなった。

4. pHの測定

図11に試験片を浸漬した溶液のpH値を測定した結果を示す。AS0.06gでは30分、1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、1日、7日、28日そして56日後のpHはそれぞれ 6.08 ± 0.04 , 6.21 ± 0.03 , 6.27 ± 0.04 , 6.29 ± 0.04 , 6.29 ± 0.04 , 6.29 ± 0.04 , 6.37 ± 0.05 , 6.85 ± 0.03 , 7.03 ± 0.04 , 7.17 ± 0.20 となった。AS0.08gでは30分、1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、1日、7日、28日そして56日後のpHはそれぞれ 6.03 ± 0.01 , 6.14 ± 0.03 , 6.21 ± 0.04 , 6.23 ± 0.03 , 6.26 ± 0.03 , 6.27 ± 0.03 , 6.48 ± 0.04 , 6.90 ± 0.07 , 7.09 ± 0.06 , 7.19 ± 0.09 となった。AS0.1gでは30分、1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、1日、7日、28日そして56日後のpHはそれぞれ 6.56 ± 0.11 , 6.56 ± 0.05 , 6.80 ± 0.04 , 6.76 ± 0.05 , 6.72 ± 0.05 , 6.69 ± 0.04 , $6.83 \pm$

表5：圧縮強さ 二元分散分析結果

Source	Sum of Square	Degree of Freedom	Mean Square	F value	Rate of Contribution
A : Kind of Hydroxyapatite	SA=417.080	1	VA=417.080	FA=197.906**	50.143
B : Quantity of Chitosan	SB=222.672	2	VB=111.336	FB=52.829**	26.397
A×B	SAB=111.952	2	VAB=55.976	FAB= 26.561**	13.019
Error	SE=75.869	36	VE=2.107		10.441
Total	S=827.573	41			

* : $P < 0.05$ ** : $P < 0.01$

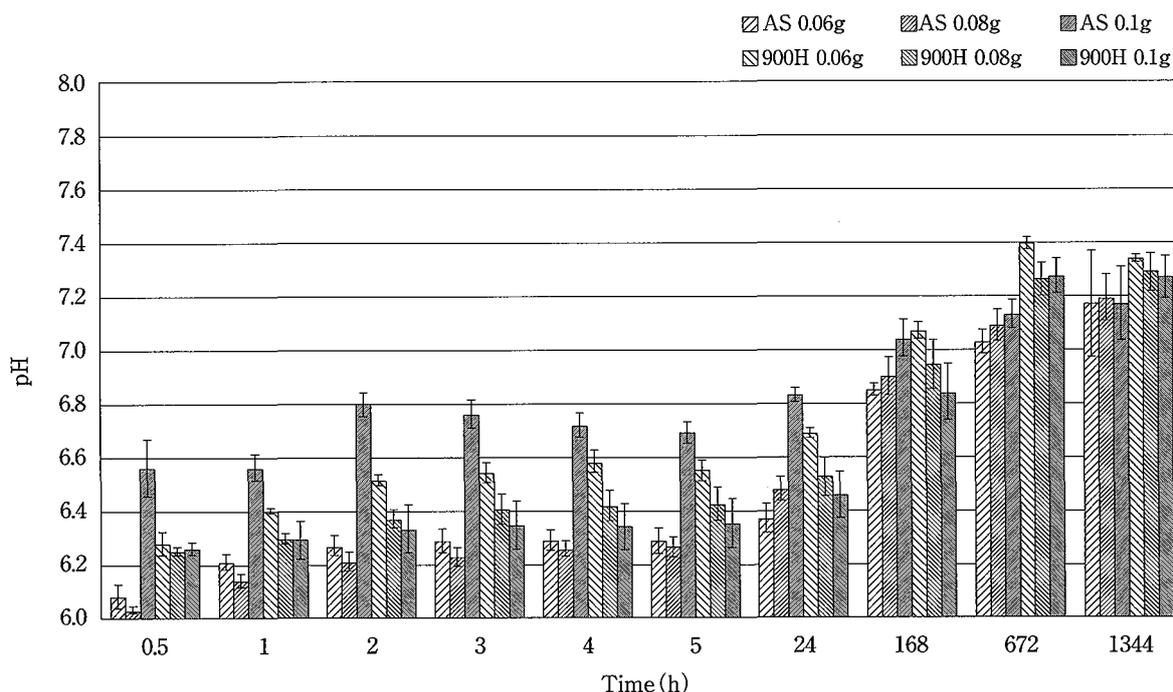


図11：pH変化測定結果

表6：pH変化 三元分散分析結果

Source	Sum of Square	Degree of Freedom	Mean Square	F value	Rate of Contribution
A : Time	SA=36.004	9	VA=4.000	FA=1012.819**	82.691
B : Kind of Hydroxyapatite	SB=0.164	1	VB=0.164	FB=41.588**	0.369
C : Quantity of Chitosan	SC=1.161	2	VC=0.580	FC=147.035**	2.652
A×B	SAB=0.375	9	VAB=0.041	FAB=10.555**	0.781
B×C	SBC=3.442	2	VBC=1.721	FBC=435.834**	7.897
A×C	SAC=0.623	18	VAC=0.034	FAC=8.769**	1.270
A×B×C	SABC=0.778	18	VABC=0.043	FABC=10.942**	1.625
Error	SE=0.947	240	VE=0.003		2.715
Total	S=43.497	299			

* : P<0.05 ** : P<0.01

0.02, 7.04 ± 0.07, 7.13 ± 0.05, 7.17 ± 0.14 となった。900H0.06gでは30分, 1時間, 2時間, 3時間, 4時間, 5時間, 1日, 7日, 28日そして56日後のpHはそれぞれ6.28 ± 0.05, 6.40 ± 0.01, 6.51 ± 0.02, 6.54 ± 0.04, 6.58 ± 0.04, 6.55 ± 0.03, 6.69 ± 0.02, 7.07 ± 0.03, 7.40 ± 0.02, 7.34 ± 0.01となった。900H0.08gでは30分, 1時間, 2時間, 3時間, 4時間, 5時間, 1日, 7日, 28日そして56日後のpHはそれぞれ6.25 ± 0.01, 6.30 ± 0.02, 6.37 ± 0.03, 6.41 ± 0.05, 6.42 ± 0.05, 6.43 ± 0.06, 6.53 ± 0.07, 6.95 ± 0.09, 7.26 ± 0.06, 7.29 ± 0.07となった。900H0.1gでは30分, 1時間, 2時間, 3時間, 4時間, 5時間, 1日, 7日, 28日そして56日後のpHはそれぞれ6.26 ± 0.02, 6.29 ± 0.07, 6.33 ± 0.09, 6.35 ± 0.09, 6.34 ± 0.09, 6.35 ± 0.09, 6.46 ± 0.09, 6.84 ± 0.11, 7.27 ± 0.07, 7.27 ± 0.08となった。測定値を分散分析した結果を表6に示す。ハイドロキシアパタイトの種類とキトサン量はpHに有意 (P<0.01) に寄与する結果が得られた。また, 浸漬期間もpHに有意 (P<0.01) に寄与する結果が得られた。

5. 溶出元素量の測定

Controlの生理食塩水はCa, P, Znイオンとも, 測定に使用した高周波プラズマ発光分析装置

の定量下限 (Ca=0.03mg/l P=0.04mg/l Zn=0.001mg/l) 以下であった。

1) Caイオンの溶出量

図12に使用材料と56日後のCaイオン溶出量についての関係を示す。Caイオン溶出量はAS0.06gで58.53 ± 1.27mg/l, AS0.08gで56.53 ± 2.32mg/l, AS0.1gで53.33 ± 4.14mg/l, 900H0.06gで41.50 ± 0.96mg/l, 900H0.08gで41.07 ± 0.98mg/l, 900H0.1gで40.10 ± 0.56 mg/lであった。測定値を分散分析した結果を表7に示す。900Hを用いた場合にCaイオンの溶出量は有意

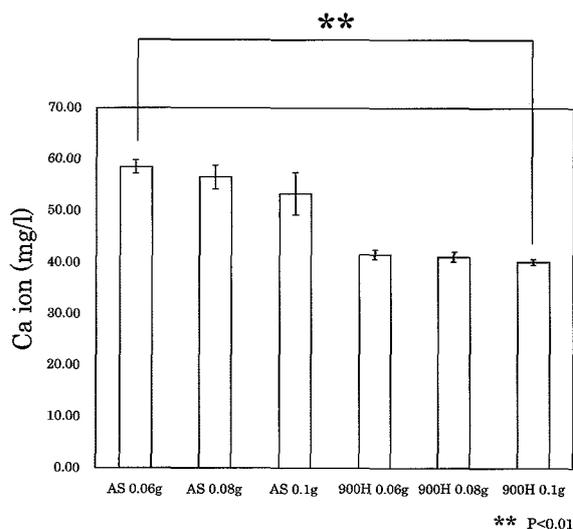


図12：Ca溶出量測定結果

表7：Ca溶出量 二元分散分析結果

Source	Sum of Square	Degree of Freedom	Mean Square	F value	Rate of Contribution
A : Kind of Hydroxyapatite	SB=1045.769	1	VB=1045.769	FB=238.730**	91.134
B : Quantity of Chitosan	SA=33.421	2	VA=16.711	FA=3.815	0.000
A×B	SAB=10.941	2	VAB=5.471	FAB=1.249	0.000
Error	SE=52.567	12	VE=4.381		8.866
Total	S=1142.698	17			

* : P<0.05 ** : P<0.01

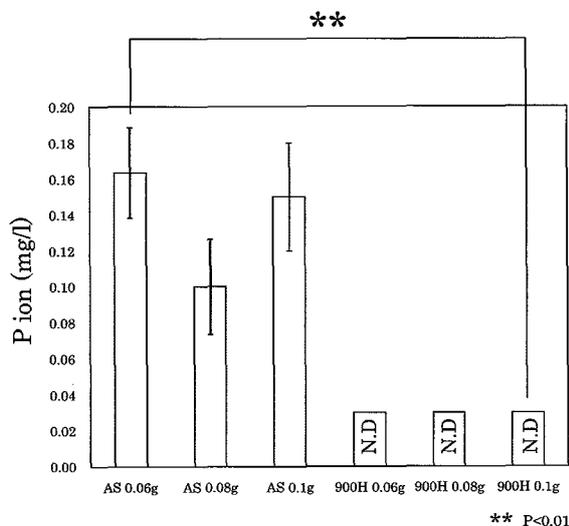


図13：P 溶出量測定結果

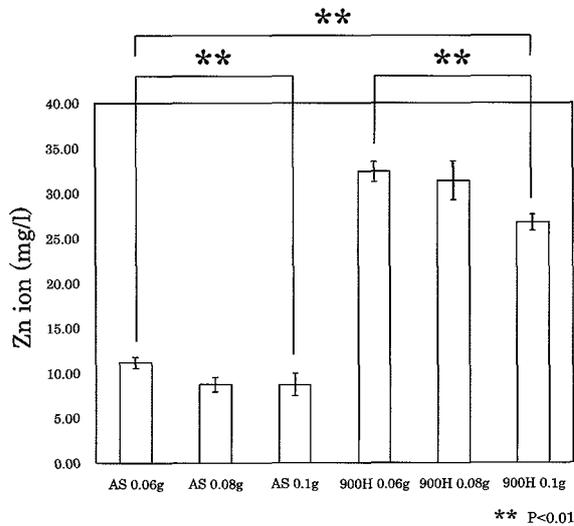


図14：Zn 溶出量測定結果

表 8：P 溶出量 二元分散分析結果

Source	Sum of Square	Degree of Freedom	Mean Square	F value	Rate of Contribution
A : Kind of Hydroxyapatite	SA=0.052	1	VA=0.052	FA=140.433**	82.540
B : Quantity of Chitosan	SB=0.003	2	VB=0.002	FB=4.493*	4.762
A×B	SAB=0.003	2	VAB=0.002	FAB=4.493*	4.762
Error	SE=0.004	12	VE=0.000		7.937
Total	S=0.063	17			

* : P<0.05 ** : P<0.01

表 9：Zn 溶出量 二元分散分析結果

Source	Sum of Square	Degree of Freedom	Mean Square	F value	Rate of Contribution
A : Kind of Hydroxyapatite	SA=1913.536	1	VA=1913.536	FA=1222.820**	95.629
B : Quantity of Chitosan	SB=50.165	2	VB=25.082	FB=16.029**	2.353
A×B	SAB=16.878	2	VAB=8.439	FAB=5.393*	0.688
Error	SE=18.778	12	VE=1.565		1.331
Total	S=1999.357	17			

* : P<0.05 ** : P<0.01

(P<0.01) に少なくなった。

2) P イオンの溶出量

図13に使用材料と56日後のPイオン溶出量についての関係を示す。Pイオン溶出量はAS0.06gで0.16±0.03mg/l, AS0.08gで0.10±0.03mg/l, AS0.1gで0.15±0.03mg/l, 900Hを用いた場合, 0.06g, 0.08g, 0.1gとも定量下限の0.03mg/lを下回った。測定値を分散分析した結果を表8に示す。900Hを用いた場合にPイオンの溶出量は有意(P<0.01)に少なくなった。

3) Zn イオンの溶出量

図14に使用材料と56日後のZnイオン溶出量についての関係を示す。Znイオン溶出量はAS

0.06gで11.20 ± 0.60mg/l, AS0.08gで8.75 ± 0.81mg/l, AS0.1gで8.72 ± 1.26mg/l, 900H 0.06gで32.40 ± 1.13 mg/l, 900H0.08 gで31.40 ± 2.16mg/l, 900H0.1gで26.73 ± 0.91mg/lであった。測定値を分散分析した結果を表9に示す。キトサン量が増加するとZnイオンの溶出量は有意(P<0.01)に少なくなった。また900Hを用いた場合にZnイオンの溶出量は有意(P<0.01)に多くなった。

6. 浸漬前後の試験片の表面観察と表面粗さの測定

図15はASを用いた試験片のそれぞれの表面を観察した結果である。浸漬前ではハイドロキシア

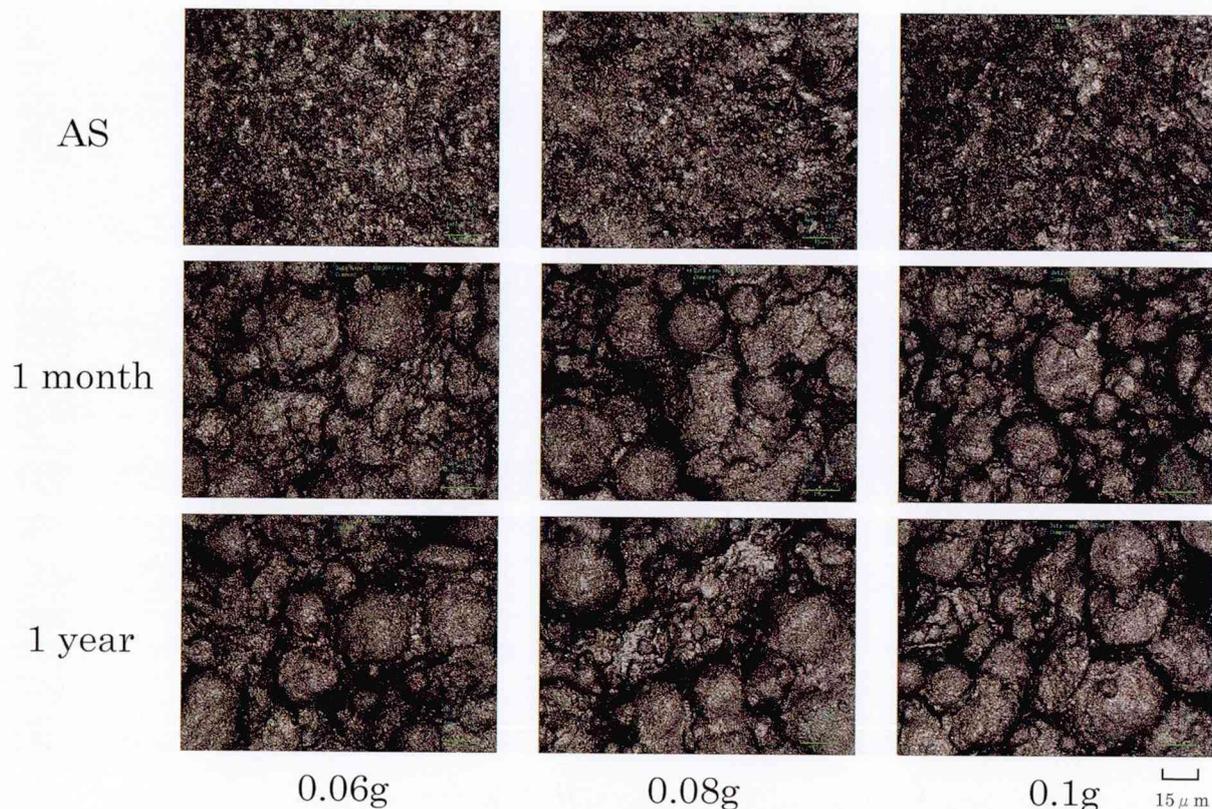


図15：浸漬前後の表面状態（AS）

表10：浸漬前後の表面粗さの変化 三元分散分析結果

Source	Sum of Square	Degree of Freedom	Mean Square	F value	Rate of Contribution
A : Time	SA=10.338	2	VA=5.169	FA=59.589**	49.060
B : Kind of Hydroxyapatite	SB=0.124	1	VB=0.124	FB=1.432	0.000
C : Quantity of Chitosan	SC=0.078	2	VC=0.039	FC=0.453	0.000
A×B	SAB=0.197	2	VAB=0.099	FAB=1.141	0.000
B×C	SBC=0.345	2	VBC=0.173	FBC=1.998	0.000
A×C	SAC=2.330	4	VAC=0.582	FAC=6.744**	9.576
A×B×C	SABC=1.091	4	VABC=0.273	FABC=3.159*	3.599
Error	SE=6.217	72	VE=0.086		37.765
Total	S=20.720	89			

* : P<0.05 ** : P<0.01

パタイトはキトサンに包まれた状態で分布しており、試験片の表面は平滑な状態が観察された。キトサン量による差は認められなかった。浸漬後の試験片では部分的に、球状のハイドロキシアパタイト粒子の輪郭が明らかとなっていた。

図16は900Hを用いた試験片のそれぞれの表面を観察した結果である。ASを用いた試験片と同様に、浸漬前ではハイドロキシアパタイトはキトサンに包まれた状態で分布しており、試験片の表面は平滑な状態が観察された。浸漬後の試験片では部分的に、球状のハイドロキシアパタイト粒子

の輪郭が明らかとなっていた。

また、キトサン量とハイドロキシアパタイトの種類に関わらず、試験片は浸漬後も原型を維持していた。

図17は浸漬前後の表面粗さの変化を示す。浸漬前においては、ASと比較して900Hを用いた試験片の表面粗さが大きくなる傾向が認められた。測定値を分散分析した結果を表10に示す。浸漬期間が長くなると表面粗さは有意 (P<0.01) に大きくなった。

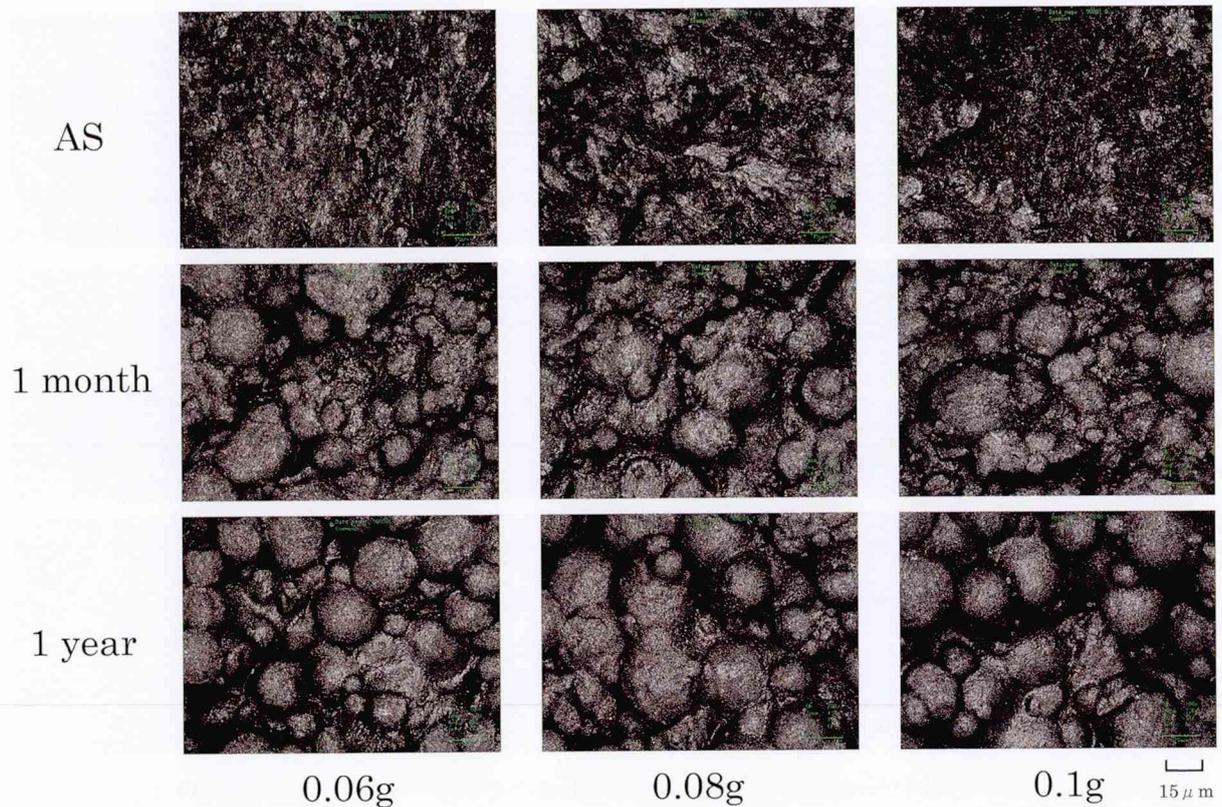


図16：浸漬前後の表面状態（900H）

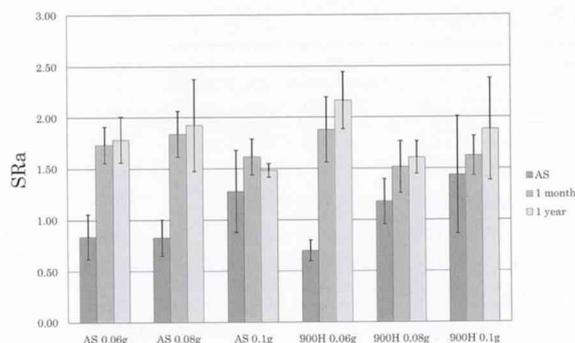


図17：浸漬前後の表面粗さ測定結果

7. X線マイクロアナライザによる成分分析

図18～20はAS、図21～23は900Hを用いた試験片表面の成分分布状態を示す。浸漬前は各元素とも成分分布は均質であり、浸漬後には、各元素の濃度分布に差が認められた。

Caは浸漬前には試験片全体に分布していたが、浸漬後においてはハイドロキシアパタイト顆粒表面部分に多く認められた。また浸漬後において、ASのハイドロキシアパタイトを用いた場合より900Hを用いた場合の方がハイドロキシアパタイト顆粒表面のCaは高濃度であった。また、1カ月浸漬後と1年浸漬後には大きな差は認

められなかった。

Pは浸漬前、浸漬後のどちらの場合においても試験片全体に分布していた。浸漬前と比較して浸漬後にはハイドロキシアパタイト顆粒の表面に高濃度に検出された。ハイドロキシアパタイトの種類とキトサン量による差は認められなかった。また、1カ月浸漬後と1年浸漬後には大きな差は認められなかった。

Znはすべての試験片において、Caが少ない部分に多く分布し、Caが多い部分に少量分布していた。またハイドロキシアパタイトの種類とキトサン量による差は認められなかった。また、1カ月浸漬後と1年浸漬後には大きな差は認められなかった。

8. 組織反応試験

図24はASのハイドロキシアパタイト、図25は900Hのハイドロキシアパタイトを用いた試験片のヘマトキシリン-エオシン染色の結果である。

組織観察の結果、各硬化体に対する組織反応はそれぞれ類似しており、エオシン好染のキトサン中にハイドロキシアパタイトが切片作製時に脱灰されたと考えられる部分が白く抜けている像が認められた。

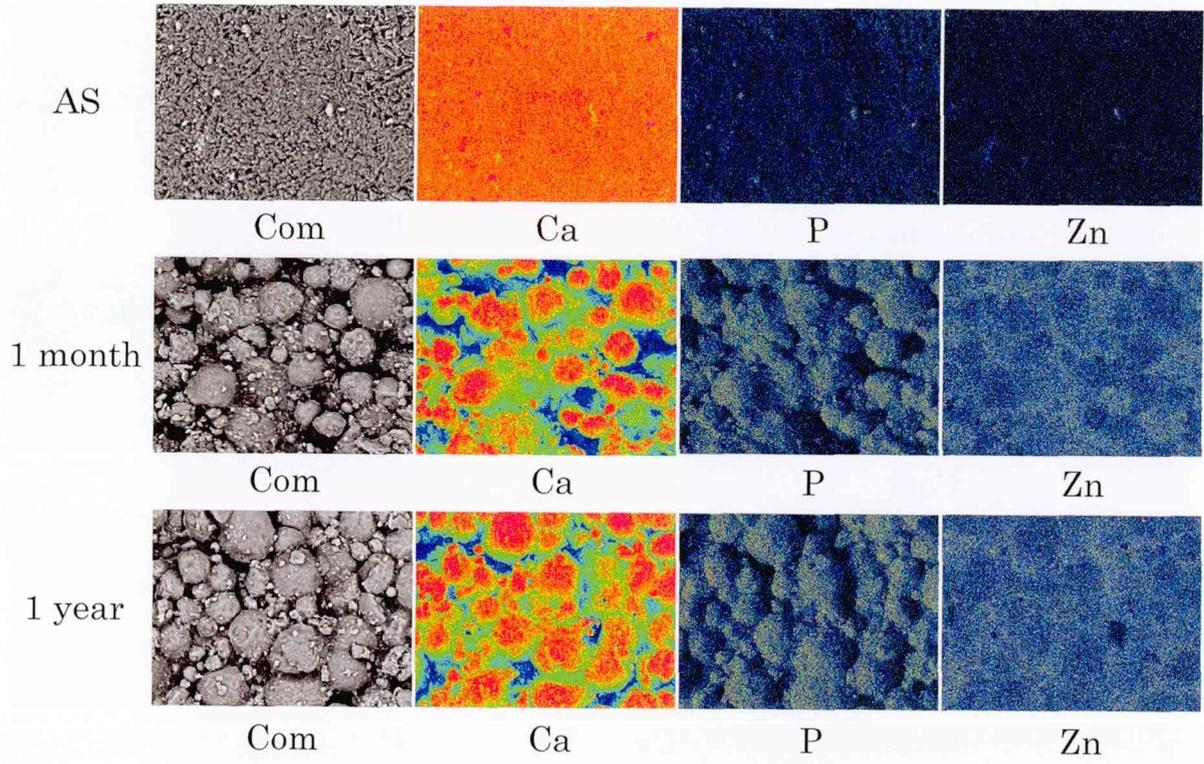


図18：浸漬前後の表面元素分布状態 (AS0.06g)

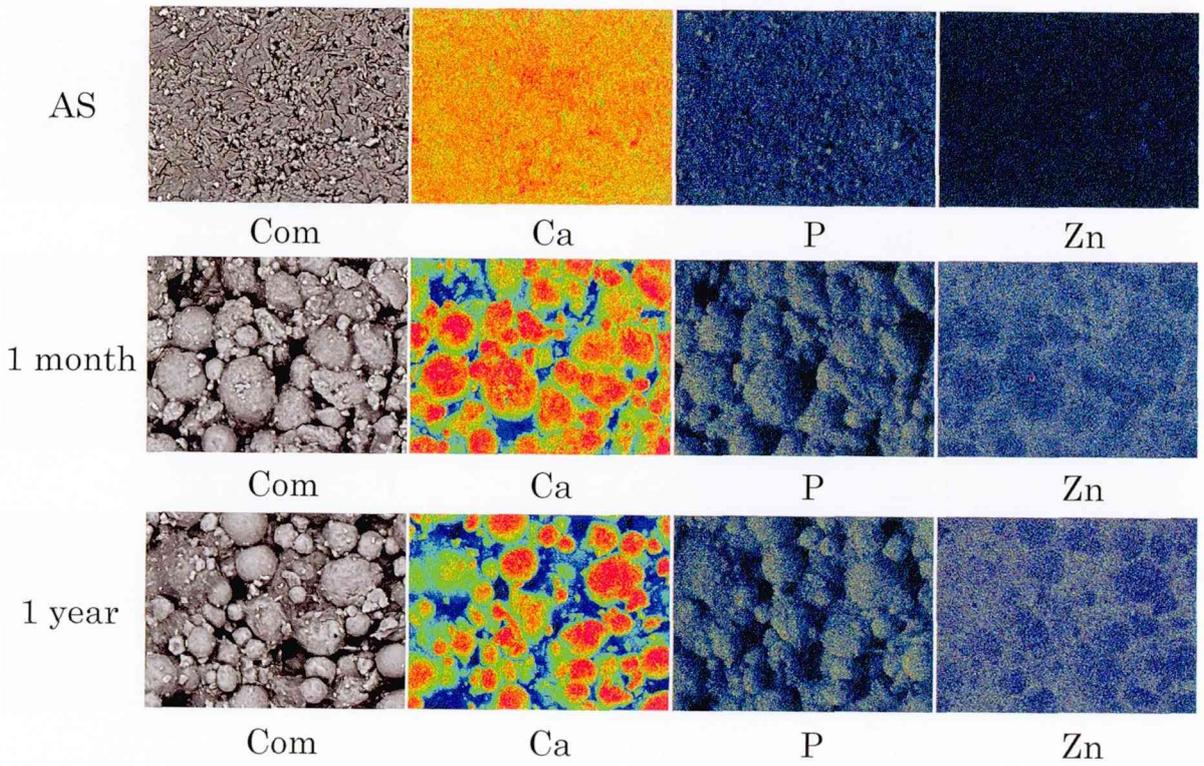


図19：浸漬前後の表面元素分布状態 (AS0.08g)

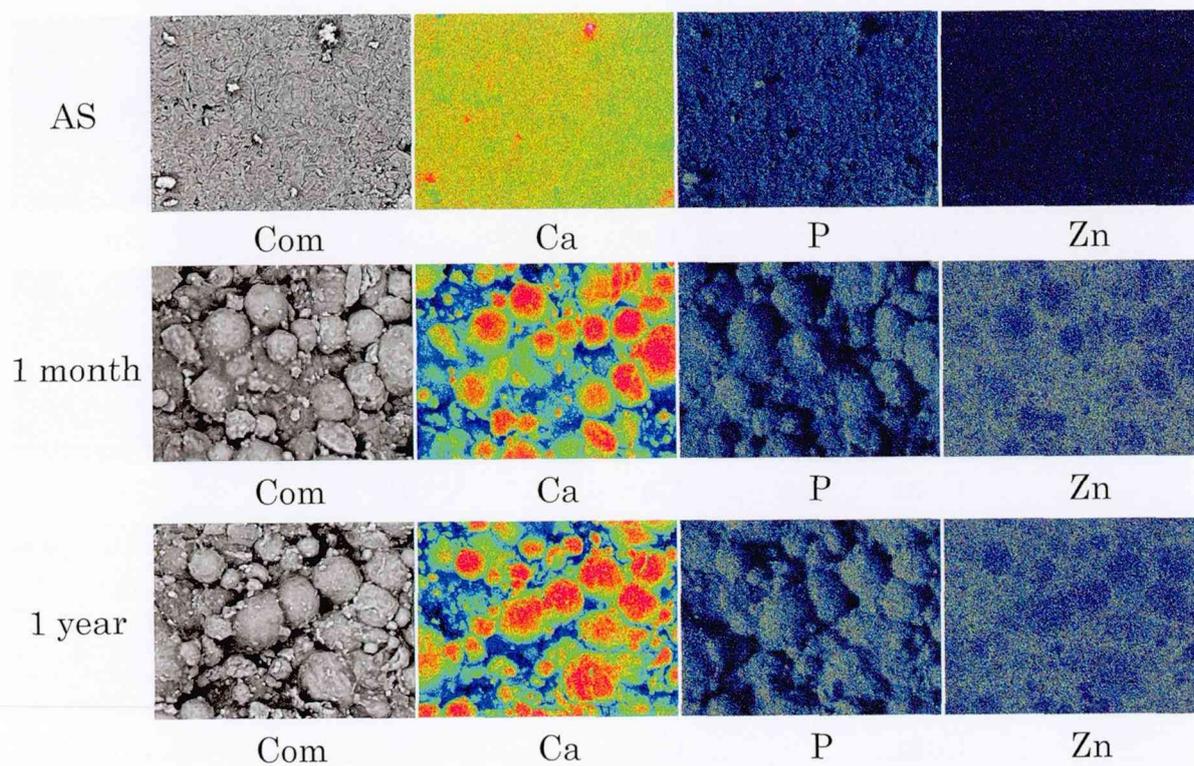


図20：浸漬前後の表面元素分布状態（AS0.1g）

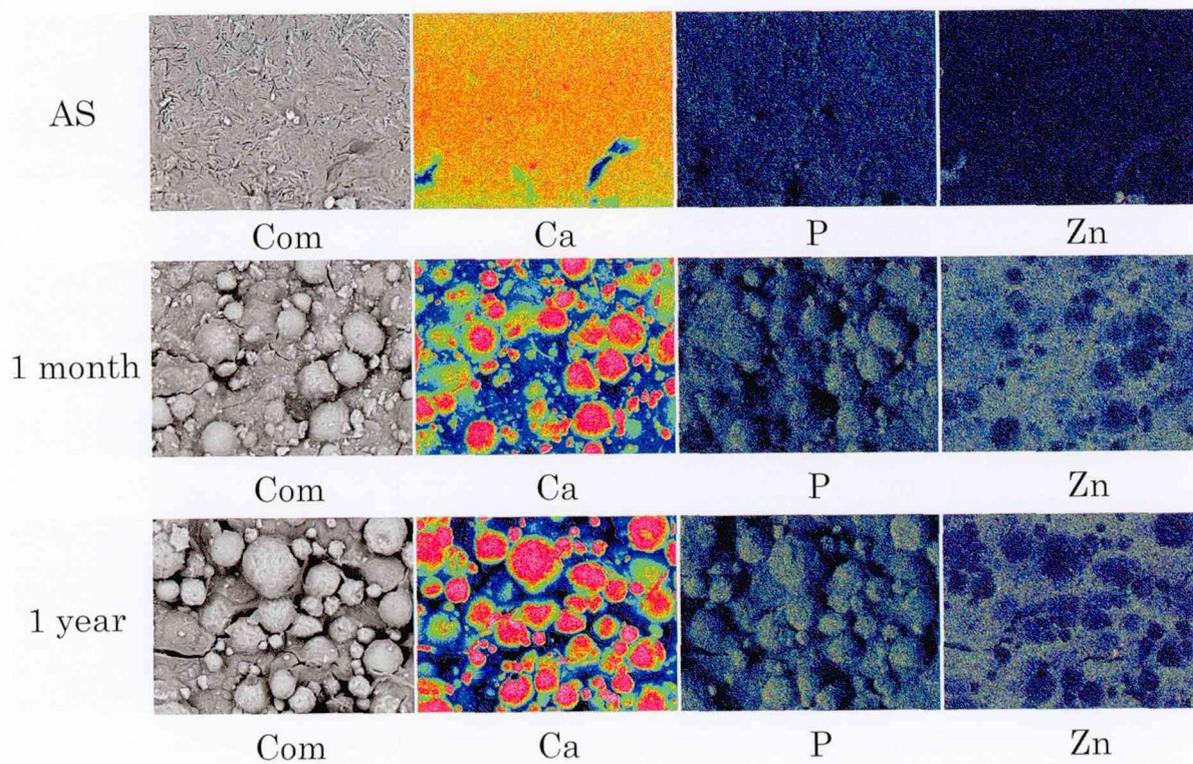


図21：浸漬前後の表面元素分布状態（900H0.06g）

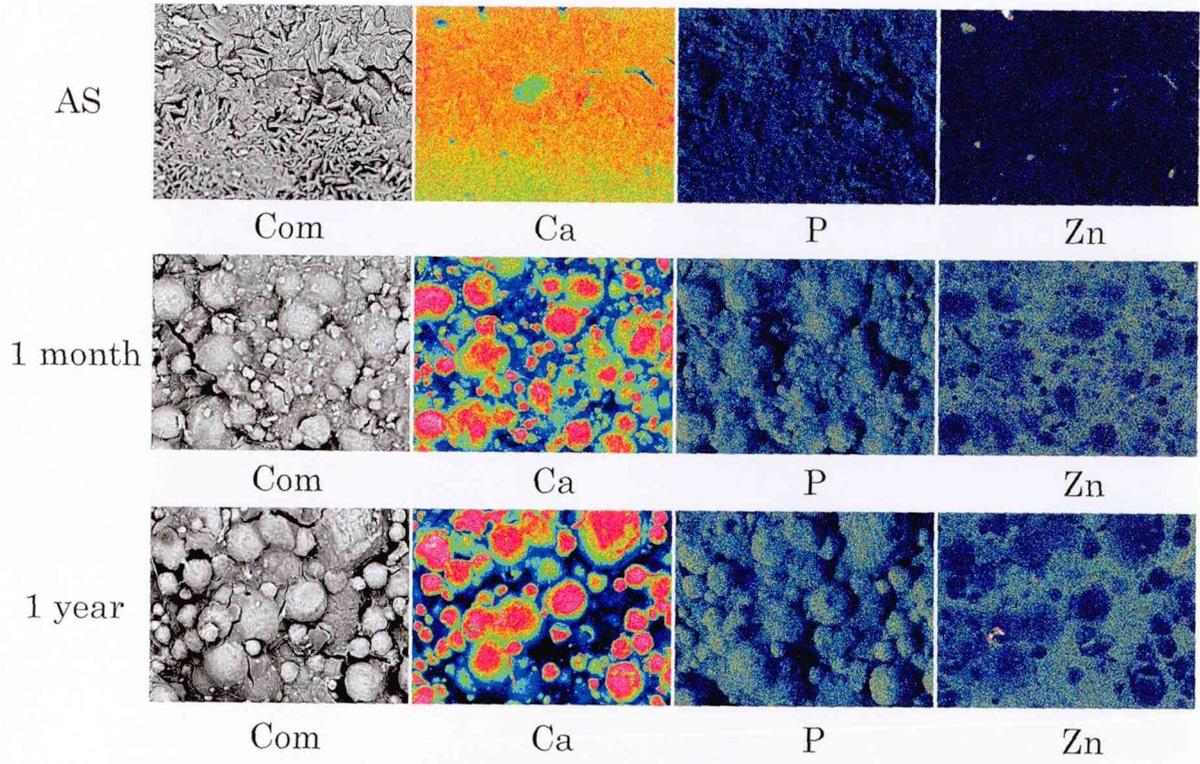


図22：浸漬前後の表面元素分布状態 (900H0.08g)

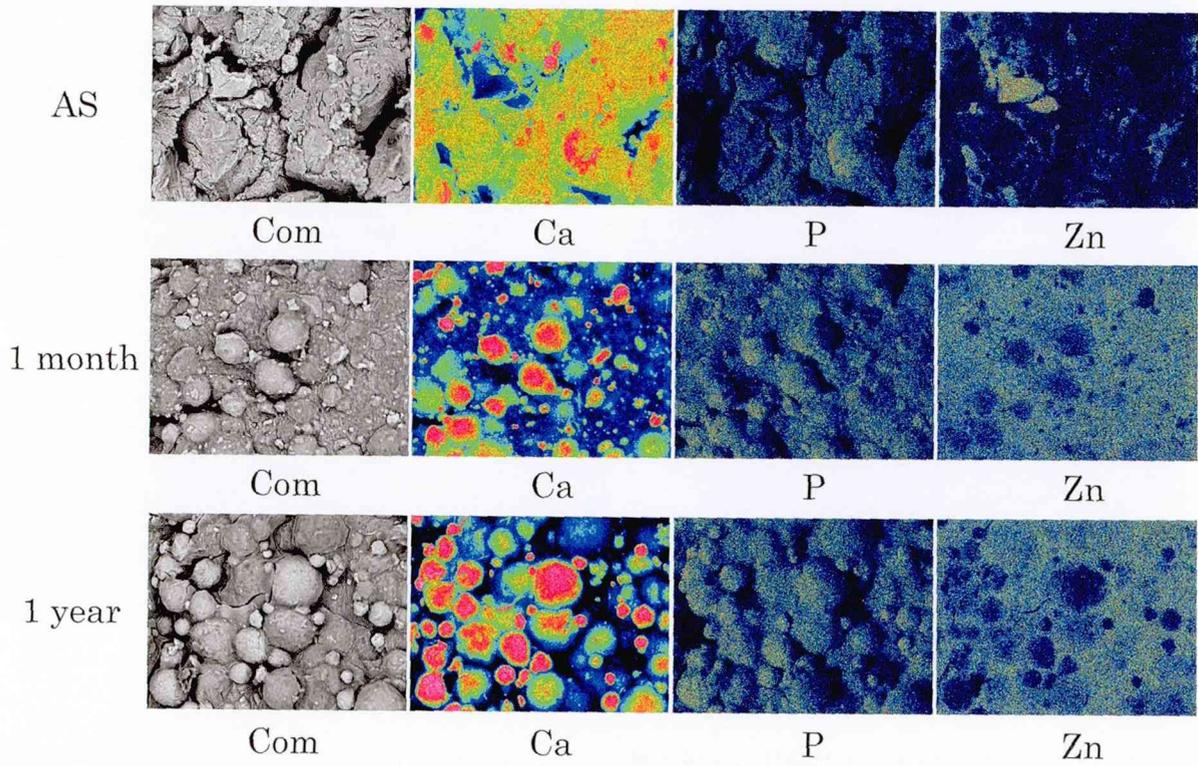
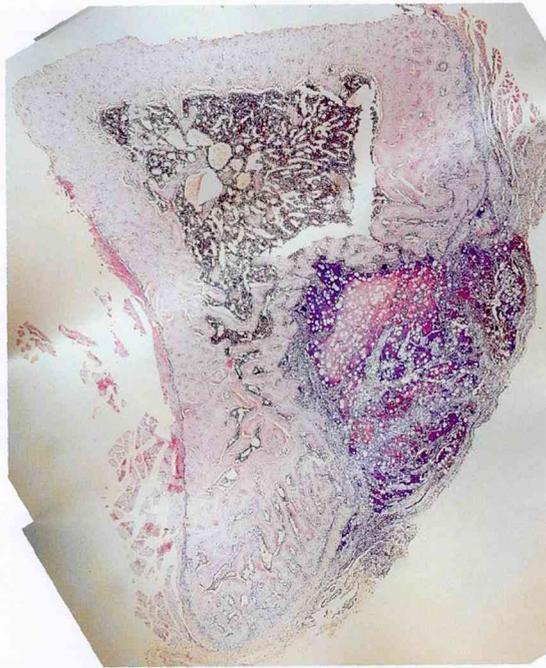


図23：浸漬前後の表面元素分布状態 (900H0.1g)

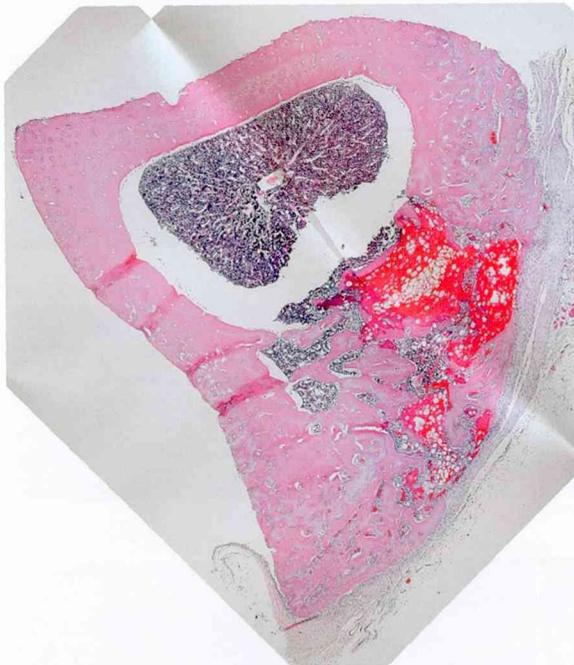


2W

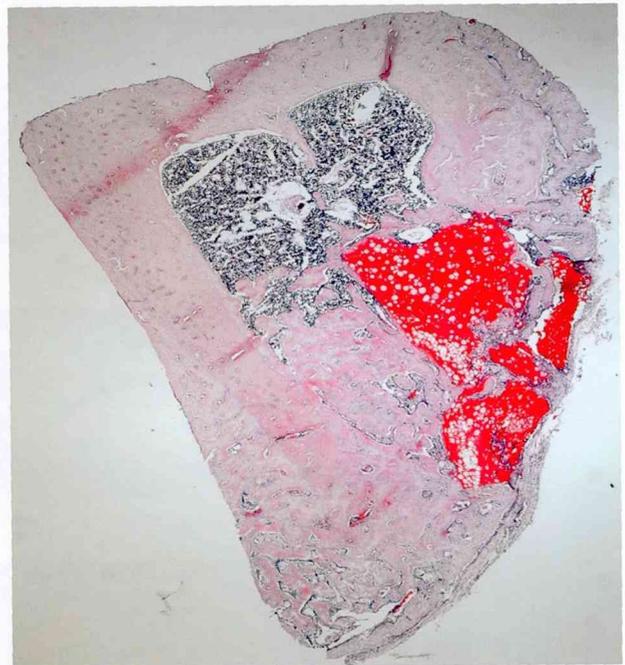


4W

図24：動物実験結果（AS0.1g）



2W



4W

図25：動物実験結果（900H0.1g）

2週後においては、填入した試験片の周囲の骨から骨伝導が起こり、部分的に、新生骨で取り囲まれる傾向が認められた。900Hを用いた場合に、わずかに骨伝導が良好な結果が観察された。

4週後においては、填入した試験片の周囲はほぼ新生骨に取り囲まれる傾向が認められた。ま

た、キトサンが生体内で徐々に分解され、そこに新生骨が侵入している像も認められた。キトサン量が少ない試験片は生体内で分解され小さくなる傾向が認められたが、ハイドロキシアパタイトの種類による大きな差は認められなかった。

試料の中には、キトサンが填入部位から骨髓中

に移動してしまったものや、骨外に生理的に排除されてしまったと考えられるもの、そして完全に試料が脱離し確認できないものも一部で認められた。

Control では、2 週後と 4 週後のどちらの場合も、欠損部が認識できないほど正常な組織構造を示し、自然治癒したと考えられる像が認められた。

考 察

本研究室ではこれまでに、キトサンやハイドロキシアパタイトを用いた材料についての研究を行ってきた。これまでキトサンについては脱アセチル化度の高い、分子量の大きなキトサンを実験に使用してきた。その結果、脱アセチル化度が高いと生体の炎症性反応は弱くなるが、生体内で分散しにくくなり生体吸収性が劣るという結果であった¹⁸⁻²⁴⁾。また、一般的に分子量が小さい方が異物巨細胞などによる貪食が早期に完了すると言われていることから、本実験ではこれまで使用してきた分子量106のキトサンではなく、低分子化した分子量105のキトサンを用いた。ハイドロキシアパタイト顆粒については、20 μm 以下を使用した場合に充填した顆粒が移動して、弊害を生じた例が報告されている事や¹⁻⁴⁾、粒径の小さなハイドロキシアパタイトはマクロファージや異物巨細胞に貪食されやすく、充填部位に留めておくことが困難とされる事⁵⁾から、これまでの削片状(平均粒径10 μm)のものではなく球状(平均粒径40 μm)のものを使用した。またハイドロキシアパタイトのpHもこれまででは中性のものを使用してきたが、高温で焼成しアルカリ化したハイドロキシアパタイトを使用した方が、骨伝導や新生骨形成が良好であった事から²⁵⁾、本研究でもアルカリ化したハイドロキシアパタイトを使用した。本実験は、骨形成用材料としてハイドロキシアパタイト顆粒をキトサンで結合した材料の機械的性質と生体反応について比較検討した。

硬化時間は、練和から患部に填入するまでの操作時間を示しており、どちらのハイドロキシアパタイトを用いた場合も、約5~15分であった。練和後の硬化時間が短すぎると患部に充填するまでに硬化してしまい、良好な結果を得られない。したがって5~8分程度で硬化することが臨床応用

を考えた場合には最適だと考えられた。

硬化時間はキトサン量が多くなるにつれ短くなる傾向が認められた。900Hでは顆粒表面にCaOが析出しておりゲル化剤としての成分が多い。このためASと比較して、900Hを用いた時の方が硬化時間は短くなると予想されたが、結果は900Hを用いたときの方が若干硬化に時間がかかる傾向が認められた。硬化時間は、ZnOが6%以下の場合、CaO量によって著しく影響され²²⁾、逆にCaO量が少ない場合にZnO量の硬化時間への影響も大きくなるとされている²³⁾。今回の粉末成分の混合比はハイドロキシアパタイト(87%)、CaO(4.35%)、ZnO(8.7%)でZnOが多くなっており、CaOよりZnO量の硬化時間への影響が大きいと考えられる。このため同量のZnOを使用した本実験においては、ゲル化剤の量は硬化時間にあまり影響しなかったものと考えられる。本実験では、ゲル化剤であるZnOとCaO、そして表面にCaOの析出したハイドロキシアパタイト顆粒の量がキトサンゾルに対して多くなり、それぞれの粒子全体をキトサンゾルが取り囲むことが出来ずに隙間ができる。ここにキトサンゾルのゲル化時に起こる脱水反応の副生成物である水分が貯留し、キトサン量が少ない場合に硬化が遅くなったと考えられる。

引張強さは、キトサン量が多くなると大きくなる結果となった。これは、より多くのキトサンがハイドロキシアパタイトの粒子間を埋めることによって強さが向上したものと考えられる。ハイドロキシアパタイトの種類による差は認められなかった。

伸びは、キトサン粉末量が0.06gでは約60%、0.08gと0.1gでは、ほとんど差はなく90~100%であった。また、ハイドロキシアパタイトの種類による差は認められなかった。

弾性係数は、引張強さと同様にキトサン量が多くなると大きくなる結果となったが、ハイドロキシアパタイトの種類による差は認められなかった。

圧縮強さは、キトサン量が多くなると大きくなる傾向が認められた。ASのハイドロキシアパタイトを用いた時と比較して、900Hを用いた場合に顕著に減少していた。

本材料は、湿潤状態では弾性体であり、破断に

ともなう屈曲点が認められなかったため、乾燥させたものを圧縮強さの測定に用いた。このため、生体内などの湿潤状態で置かれた時の圧縮強さは多少異なってくると考えられる。浸漬することによってキトサンが溶解し、圧縮強さが減少することが報告されているが²⁴⁾、この現象が生体内に充填した材料に同様に生じれば、充填物の中に新生血管が浸入することが期待出来、キトサンのスパーサーとしての役割が有用となる。この新生血管の侵入に伴って細胞が増加し、骨と本材料が置換することが考えられる。

pHは練和直後では、ASで6.00~6.78, 900Hで、6.18~6.38と差は認められなかった。56日後では、ASで6.81~7.67, 900Hで、7.10~7.44であった。粉末と練和する前の、キトサンゾルのpHは、キトサン量0.06g, 0.08g, 0.1gの時にそれぞれ2.80, 3.06, 3.26と、キトサン量が多くなると高くなってはいたが、硬化後の試験片ではキトサン量によるpHの差は認められなかった。pHは練和1日後から徐々に上がり始め、練和1週間後にはpH7に近づき、浸漬期間が長くなるにつれpHは上昇傾向を示した。pHの上昇は各種イオンの溶出によって生じたものと考えられた。pHは、材料が生体内で安定して骨伝導を維持するためには、重要な因子である。細胞回復においてpH値が5以下の環境では細胞の回復度は低下することが報告されている²⁶⁾。また細胞外のpHが酸性に傾くと、破骨細胞の骨吸収活性が増すことが報告されている²⁷⁾。また、ハイドロキシアパタイトのpHによって吸着するタンパク量が異なり、細胞の動態に影響するとしており、pH8の場合、低いpH値と比較してタンパク質の吸着量が減少することも報告されている²⁸⁾。本実験におけるpHは全て6以上であり、pHによる生体為害性は見られないものと考えられた。

Caイオンの溶出量は、ASを用いた場合900Hと比較して多くなる傾向が認められた。Ca/P比が1.68のハイドロキシアパタイト顆粒は、700~1100℃で加熱した場合、加熱温度が高いほど結晶性が高くなるため、Caイオンの溶出量が減少すると報告されている²⁹⁾。一方、加熱時間が長く、加熱温度が高いほど溶出量が多くなるという報告もある^{6,8,10)}。キトサン量による差はほとんど認められなかった。溶出したCaイオンは試験片に再

吸収されるか、リン酸カルシウムの合成に消費されるとされている³⁰⁾。Caイオン濃度が細胞外で上昇すると、破骨細胞の骨吸収活性は抑制されるが、骨芽細胞との共存においては逆に、破骨細胞の活性が認められるとしており³¹⁻³³⁾、この機序については不明な点が少なくないことが報告されている³⁴⁻³⁷⁾。しかしながら、骨形成にはCaイオンの存在は重要であると考えられる。また、キトサンゾルをゲル化させるためにも必要な元素であり、pH値が増加する現象を左右する元素でもありとされる。

Pイオンの溶出はASでは認められたが、900Hにおいて測定に用いた高周波プラズマ発光分析装置の定量下限(0.03mg/l)を下回った。これは塩浜らのPイオンの溶出は加熱温度が高いほど少なくなる傾向を示すという報告⁶⁾とも一致している。したがって、900Hでは結晶性が良好なためにPイオンの溶出量は少なかったものと考えられる。さらに、ハイドロキシアパタイト粒子表面がゲル化したキトサンの被膜で包まれるか、包まれないかによって、生じる現象であるとも考えられる。900Hはゲル化剤であるCaOを表面に析出しており、キトサンゾルと接触することでゲル化して、ハイドロキシアパタイト粒子表面に被膜ができる。しかしASに関しては、表面にゲル化剤がなく粒子全体がゲル被膜に包まれないために、ハイドロキシアパタイト粒子表面と浸漬液が直接接触してPイオンの溶出が認められたものと考えられる。またPイオンの溶出に対するキトサン量による有意な差は認められなかった。Pは生体必須元素であり、70kgの体重の人で約700~780gが含まれているとされている³⁸⁾、溶出量が多い場合、骨吸収が生じやすい環境となることが報告されており³⁹⁾、多く生じないことが望ましいと考えられる。900Hを用いた場合のPイオンの溶出量は、pHの上昇による骨吸収に影響する量ではないと考えられる。

Znイオンの溶出はASと比較して900Hを用いた場合に多く認められた。これは900℃で焼成し、ハイドロキシアパタイト表面に析出したCaOが、Znより先にキトサンゾルのゲル化剤として働き、ゲル化に関わらなかったZnが遊離し、溶出したものと考えられる。またどちらのハイドロキシアパタイトを用いた場合も、キトサン

量が多くなると溶出量が減少する傾向も認められた。Zn イオンは70kgの成人で約2.3g含まれる生体必須元素で、その1/4から1/3が骨に含まれ、Zn イオンの毒性については健常人の1000倍の血漿濃度でも毒性は認められず、毒性は低いとされている³⁸⁾。また、亜鉛欠乏によって長管骨が短縮や肥厚が生じること、骨形成が出来なくなることが報告されている⁴⁰⁾。Znは核酸、たんぱく質の合成、血漿中のビタミンA濃度の維持やアルカリフォスファターゼ活性化に関与するともされる⁴¹⁾。また亜鉛は傷害部位の修復促進に寄与することが報告されている⁴²⁾。そして、亜鉛は骨芽細胞の蛋白質合成を促進し骨芽細胞の分化と増殖を促進し、破骨細胞形成を抑制することにより、骨量を増進するという報告もある^{43,44)}。したがって本実験におけるZnの溶出量は、生体に為害作用を及ぼさないものと考えられる。

浸漬した溶液のpHが上昇した原因は、Caイオンと同様、Znイオンの溶出によっても影響されたものと考えられる。

浸漬前後の試験片の表面観察では、AS、900Hともにハイドロキシアパタイトはキトサンに包まれた状態で分布しており、粒子以外の部分は平滑な状態が観察された。またキトサン量による差は認められなかった。浸漬後の試験片では部分的に、球状ハイドロキシアパタイト粒子の輪郭が明らかとなっていた。浸漬することで結合材のキトサンが徐々に溶解し、ハイドロキシアパタイトの顆粒が表面に出てきたものと考えられる。

表面粗さは浸漬前においては、ASと比較して900Hを用いた試験片の方が大きくなる傾向が認められた。浸漬後には、浸漬前と比較して表面粗さは大きくなっていったが、ハイドロキシアパタイトの種類、キトサン量による差は認められなかった。ハイドロキシアパタイト顆粒の表面は、加熱温度が高いと粗造になるとされているが²⁹⁾、ASと900Hを用いた試験片の表面粗さには影響は認められなかった。

X線マイクロアナライザによる成分分析の結果、どちらのハイドロキシアパタイトを用いた場合にも、Caは浸漬前には試験片全体に分布していた。これは、粉末成分中のCaOがハイドロキシアパタイト顆粒を包むキトサンゲルに均一に分散していたためと考えられる。浸漬後においてハ

イドロキシアパタイト顆粒表面部分に多く認められたのは浸漬によって試験片からキトサンが溶解し、ハイドロキシアパタイト顆粒が表面に出現してきた事が原因だと考えられる。またASと比較して900Hのハイドロキシアパタイトを用いた場合の方が顆粒表面のCaは高濃度に検出されたが、これは、加熱処理することによって900Hのハイドロキシアパタイト顆粒表面にCaOが析出したことが原因だと考えられる。Pは浸漬前、浸漬後のどちらの場合においても試験片全体に分布しており、浸漬後にはハイドロキシアパタイト顆粒の表面に高濃度に検出されたが、Ca同様に浸漬によって試験片からキトサンが溶解し、ハイドロキシアパタイト顆粒が表面に出現してきた事が原因だと考えられる。Znはすべての試験片において、Caが少ない部分に多く分布し、Caが多い部分における分布は少なかった。Znは、粉末成分中のZnOから溶出したと考えられるが、Caが多く分布し、キトサンゾルのゲル化にCaが多く寄与した場合には、ゲル化に寄与しないZnが遊離し、溶出することによって試験片表面のZn分布が少なくなったものと考えられる。逆にCaが少ない部分においては、Znがゲル化に寄与する割合が多くなり、溶出量が減少し、結果Znの分布が多くなったと考えられる。

組織反応試験の結果、どちらのハイドロキシアパタイトを用いた場合にも試験片周囲に幼弱な肉芽組織の形成は認められたが、著しい線維化や壊死などが惹起されたものは認められなかった。よって本材料の生体に対する為害作用は弱いものと推察された。また、本材料と同様の材料をラットの皮下組織やカイウサギの骨膜下に埋入した実験においても生体に対する為害作用が弱く、骨伝導能が認められたと川上らは報告している^{45,46)}。

本実験では3種類のキトサン量を用いたが、キトサン量が少ない方が生体内で早期に分散しやすく、キトサン量が多い方が元の形態を維持している傾向が認められた。またハイドロキシアパタイトはpHの異なる2種類を使用したが、900Hを用いた方が骨伝導と骨形成が早期に生じる傾向が認められた。この結果は、骨形成に関してアパタイトは結晶質が高いほど骨伝導しやすいという報告⁴⁷⁾と一致する。また、骨芽細胞を用いた培養実験において、ASと比較して900Hを用いた場合

にALP陽性骨芽細胞数の著明な増加が認められたと報告されている¹¹⁾。また、ハイドロキシアパタイト無添加群と比較して、ASを用いた場合にALP活性は低下し、900Hを用いた場合では、ASと比較して高値を示したとも報告されている¹¹⁾。これらの詳しいメカニズムは分かっていないがCaイオンの溶出量が影響していると考えられている。

その他に、ASと比較して、900Hを用いた場合にZnイオン溶出量が多くなったが、Znは生体が多く機能を発現するための必須元素であり、創傷治癒や、骨形成に深く関わっていると言われており、Znイオン溶出量が多い900Hを用いた場合に骨形成が早期に生じる傾向を示したものと考えられた。

試験片の一部では、練和が手作業であることによるキトサンゾル中のハイドロキシアパタイトなど粉末成分の成分分布の不均一が生じていた。これは生体反応に少なからず影響していることが考えられるために、均一に練和する方法について検討する必要性が示唆された。

結 論

本実験は、骨形成用材料としてpHの異なるハイドロキシアパタイト顆粒をキトサンで結合した材料の機械的性質と生体反応について比較検討した。その結果、以下の結論が得られた。

1. 硬化時間は、キトサン量が多くなるほど短くなる傾向が認められた。ハイドロキシアパタイトの種類による有意差は認められなかった。
2. 引張強さ、伸び、弾性係数ともにキトサン量が多くなるほど大きくなる傾向が認められたが、ハイドロキシアパタイトの種類による有意差は認められなかった。
3. 圧縮強さは、キトサン量が多くなるほど大きくなる傾向が認められた。またASと比較して900Hを用いた時に圧縮強さが顕著に小さくなった。
4. pHは練和直後の6～6.6から、56日後には7～7.4と上昇していた。56日後ではASと比較して、アルカリ化した900Hを用いた場合にpHが高くなる傾向が認められた。
5. Caイオン溶出量はASと比較し900Hの場合に減少していた。またキトサン量が多くなる

とCaイオン溶出量は減少する傾向も認められた。Pイオン溶出量はASで0.07～0.19mg/lとなり、900Hの場合は定量下限の0.03mg/lを下回った。キトサン量による有意差は認められなかった。Znイオン溶出量はASと比較して900Hを使用した場合に多くなった。またキトサン量が多くなるとZnイオン溶出量は減少する傾向が認められた。

6. 表面観察の結果、浸漬前はハイドロキシアパタイト顆粒を結合しているキトサンが、浸漬することで崩壊し、浸漬後はハイドロキシアパタイト顆粒が表面に出ていた。これに伴い、表面粗さも大きくなる傾向が認められた。
7. X線マイクロアナライザによる成分分析においては、浸漬前は各元素とも成分分布は均質であり、浸漬後には、各元素の濃度分布に差が認められた。Znはすべての試験片において、Caが少ない部分に多く分布し、Caが多い部分に少量分布していた。
8. 組織反応試験の結果、キトサン量が少ない方が生体内で分散しやすい傾向が認められた。また900Hを用いた方が骨伝導と骨形成が早期に生じる傾向が認められた。

謝 辞

本研究に際し、終始御指導、御鞭撻を賜りました松本歯科大学大学院歯学独立研究科硬組織疾患制御再建学講座生体材料学、伊藤充雄教授、永沢 栄准教授、吉田貴光講師、ならびに溝口利英講師に深甚なる感謝の意を表します。

また、本研究の遂行にあたり、多大なる御協力を頂きました松本歯科大学ハイテクセンター電子顕微鏡室主任技士・赤羽章司氏、積水化成工業株式会社・佐伯達哉氏、焼津水産化学株式会社・又平芳春氏、ならびに株式会社島津総合分析試験センター・大森良久氏に深謝申し上げます。

本論文の要旨は、第37回日本口腔インプラント学会において発表した。

文 献

- 1) 長田哲次, 大石正道, 白土雄司, 樋口勝槻 (1992) 顎骨の小欠損へのヒドロキシアパタイト使用症例術後経過の検討. 口科誌 41: 695-707.
- 2) 白川正順, 長谷川秀行, 野村 健, 宇沢俊一,

- 伊藤隆康, 中村 慎, 咲間 茂, 都田芳弘 (1986) ハイドロキシアパタイトの臨床経過-予後不良例の検討-. 口科誌 **32**: 2672-80.
- 3) 高木幸人 (1988) Hydroxyapatite による歯槽堤造成の失敗症例から学ぶ. 日歯評論 **543**: 57-68.
 - 4) Misiek DJ, Kent JN and Carr RF (1984) Soft tissue responses to hydroxyapatite particles of different shapes. J Oral Maxillofac Surg **42**: 150-60.
 - 5) 富井康年 (1987) 合成ハイドロキシアパタイトセラミック微粒子に対する組織反応. 新潟歯誌 **17**: 65-82.
 - 6) 塩浜康良, 福里英彦, 油谷一裕, 白鳥徳彦, 伊藤充雄 (2003) 骨補填材としての加熱処理の球状ハイドロキシアパタイトからの Ca イオンの溶出と pH 値への影響. 日口腔インプラント誌 **16**: 390-9.
 - 7) Raynaud S, Champion E, Lafon JP and Bernache-Assollant D (2002) Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio III. Mechanical properties and degradation in solution of hot pressed ceramics. Biomaterials **23**: 1081-9.
 - 8) 山道在明, 遠藤省吾, 遠藤富夫, 溝口利英, 伊藤充雄 (2005) 骨補填材としての球状ハイドロキシアパタイトの加熱処理法の違いによる浸漬液の pH 変化. 日口腔インプラント誌 **18**: 22-30.
 - 9) 岩田耕三 (1990) ハイドロキシアパタイト (HAP) の組成, 表面性状, 溶解性が骨伝導性および組織親和性に与える影響. 口科誌 **39**: 1039-65.
 - 10) 織井弘道 (1999) 骨芽細胞様細胞の細胞増殖石灰化物形成および細胞外マトリックス成分の発現におよぼすカルシウムイオンの影響. 日歯学 **73**: 558-66.
 - 11) 浅見彩路, 中村美どり, 宇田川信之, 宮沢裕夫 (2006) 球状ヒドロキシアパタイトの加熱処理による骨芽細胞の分化促進. 小児歯誌 **44**: 284.
 - 12) 木船紘爾 (1994) キチン, キトサンのメディカルへの応用, 第 1 版, 45, 技報堂, 東京
 - 13) 矢吹 稔 (1990) キチン, キトサンの応用, 第 1 版, 104-14, 技報堂, 東京
 - 14) Zucker WH and Mason RG (1976) Ultrastructural aspects of interactions of platelets with microcrystalline collagen. Am J Pathol **82**: 129-40.
 - 15) 前田陸浩, 井上幸雄, 遠藤隆二, 吉村昌也, 鶴谷良一 (1993) キチン止血剤に関する研究. 第 7 回キチン・キトサンシンポジウム講演要旨集, 37-8.
 - 16) 長祥 隆 (1995) キチン, キトサンハンドブック, 第 1 版, 409, 技報堂, 東京
 - 17) 矢吹 稔, 石川文保, 大宝 明, 島原健二 (1988) 最後のバイオマス キチン, キトサン, 第 1 版, 11-2, 技報堂, 東京
 - 18) Ito M (1991) In vitro properties of a chitosan-bond hydroxyapatite bone - filling paste. Biomaterials **12**: 41-5.
 - 19) 横山宏太, 森 厚二, 山倉和典, 中島三晴, 五十嵐俊男, 日高勇一, 伊藤充雄 (1997) キチン・キトサンに関する研究その 4. ウサギ脛骨骨膜下における合成ハイドロキシアパタイト含有キチン・キトサンフィルムの病理組織学的観察: キチン・キトサンの脱アセチル化度および分子量の影響. 日口腔インプラント誌 **10**: 44-50.
 - 20) 日高勇一, 森 厚二, 中島三晴, 五十嵐俊男, 矢ヶ崎 裕, 鈴木和夫, 伊藤充雄 (1998) キチン・キトサンに関する研究その 8. 合成ハイドロキシアパタイト含有キチン・キトサンフィルムのラット頭蓋骨骨膜下における病理組織学的検索. 日口腔インプラント誌 **11**: 34-41.
 - 21) 日高勇一, 伊藤充雄, 横山宏太, 森 厚二, 山倉和典, 中島三晴, 五十嵐俊男 (1998) キチン・キトサンフィルムに対するラット皮下組織反応およびその機械的性質. 生体材料 **16**: 66-71.
 - 22) 伊藤充雄, 山岸利夫, 菅井敏郎 (1990) ハイドロキシアパタイトをキトサンで練和した骨補填材について. 歯材器 **9**: 608-16.
 - 23) 伊藤充雄, 新納 亨, 森 厚二, 横山宏太, 山岸利夫 (1994) (その 3) β 型リン酸 3 カルシウムをキトサンで練和した骨補填剤について. 歯材器 **13**: 9-16.
 - 24) 中島三晴 (2003) キトサンを結合体とした自己硬化型骨補填材の研究. 松本歯学 **29**: 157-69.
 - 25) 渡邊敏之, 二宮 禎, 細矢明宏, 森山敬太, 佐原紀行, 小澤英浩, 溝口利英, 佐伯達哉, 伊藤充雄 (2004) 加熱処理が球状ハイドロキシアパタイトの骨欠損部での骨伝導能に与える影響. 松本歯学 **30**: 228-37.
 - 26) 松本良造, 今井弘一 (1993) 細胞回復度試験法の確立に関する基礎的検討 初期細胞数と細胞回復時間について. 歯材器 **12**: 374-92.
 - 27) Arnett TR and Dempster DW (1986) Effect of pH on bone resorption by rat osteoclasts in vitro. Endocrinology **119**: 119-24.
 - 28) Sharpe JR, Sammons RL and Marguis PM (1997) Effect of pH on protein adsorption to hydroxyapatite and tricalcium phosphate ceramics. Biomaterials **18**: 471-6.
 - 29) 白鳥徳彦, 村田 巧, 上野栄一, 久保一美, 伊藤充雄 (2000) 骨補填剤としての球状ハイドロキシアパタイトからの Ca イオンの溶出. 日口腔

- インプラント誌 **13** : 289-94.
- 30) Franks K, Abrahams I and Knowles JC (2000) Development of soluble glasses for biomedical use part 1. In vitro solubility measurement. *J Mater Sci* **11** : 609-14.
- 31) Zaidi M, Datta HK, Patchell A, Moonga B and Macintyer I (1989) Calcium-activated intracellular calcium elevation. a novel mechanism of osteoclast regulation. *Biochem Biophys Res Com* **163** : 1461-5.
- 32) Miyauchi A, Hruska KA, Greenfield EM, Duncan R, Alvarez J, Barattolo R, Colucci S, Zambonin-Zallone A, Teitelbaum SL and Teti A (1990) Osteoclast cytosolic calcium, regulated by voltagegated calcium channels and extracellular calcium, controls podosome assembly and bone resorption. *J Cell Biol* **111** : 2543-52.
- 33) Kaji H, Sugimoto T, Kanatani M and Chihara K (1996) High extracellular calcium stimulates osteoclast-like cell formation and bone-resorbing activity in the presence of osteoblastic cells. *J Bone Miner Res* **11** : 912-20.
- 34) Zaidi M, Datta HK, Patchell A, Moonga B and Macintyer I (1989) Calcium-activated intracellular calcium elevation. A novel mechanism of osteoclast regulation. *Biochem Biophys Res Com* **163** : 1461-5.
- 35) Miyauchi A, Hruska KA, Greenfield EM, Duncan R, Alvarez J, Barattolo R, Colucci S, Zambonin-Zallone A, Teitelbaum SL and Teti A (1990) Osteoclast cytosolic calcium, regulated by voltage-gated calcium channels and extracellular calcium, controls podosome assembly and bone resorption. *J Cell Biol* **111** : 2543-52.
- 36) Kaji H, Sugimoto T, Kanatani M and Chihara K (1996) High extracellular calcium stimulates osteoclast-like cell formation and bone-resorbing activity in the presence of osteoblastic cells. *J Bone Miner Res* **11** : 912-20.
- 37) Suda T, Nakamura I, Jimi E and Takahashi N (1997) Regulation of osteoclast function. *J Bone Miner Res* **12** : 869-79.
- 38) 桜井 弘, 田中英彦 (1994) 生体微量元素, 第1版, 196-7, 廣川書店, 東京
- 39) 小野擴仁, 溝口利英, 上條 都, 矢ヶ崎 裕, 吉田貴光, 永沢 栄, 伊藤充雄 (2001) キチン・キトサンに関する研究-アパタイト含有キトサンフィルムの生体反応-. *日口腔インプラント誌* **14** : 563-8.
- 40) 岡田 正, 高木洋治 (1984) 亜鉛と臨床. 第1版, 7, 朝倉書店, 東京
- 41) 小鹿眞理, 加藤清正 (2001) 歯学生・歯科医のための歯科栄養学. 第1版, 70, 学健書院, 東京
- 42) 藤原泰之, 桜井 繁, 坂本倫子, 鍛冶利幸 (1995) 培養血管内皮細胞層の修復に対する亜鉛の促進作用. 第6回日本微量元素学会予稿集, 70.
- 43) 山口正義 (2007) 骨質への影響 ミネラル. *The Bone* **21** : 91-6.
- 44) 山口正義 (2006) ミネラル (カルシウム, マグネシウム, フッ素, 亜鉛). *The Bone* **20** : 451-6.
- 45) Kawakami T, Antoh M, Hasegawa H, Yamagishi T, Ito M and Eda S (1992) Experimental study on osteoconductive properties of a chitosan-bonded hydroxyapatite self-hardening paste. *Biomaterials* **13** : 759-63
- 46) Kawakami T, Antoh M, Hasegawa H, Yamagishi T, Ito M and Eda S (1991) Subcutaneous tissue response to a chitosan-bonded Hydroxyapatite self-hardening paste in rats. *Med Sci Res* **19** : 725-7.
- 47) 丹羽滋郎, 高橋 忍, 宗宮正典 (1981) 骨置換材料としてのハイドロキシアパタイトの可能性について. *ファインセラミックス* **2** : 25-32.